

Afdeling Diergeneesmiddelen 1986-10-17

RAPPORT 86.98

Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Ontwikkeling van een FAST-LC
methode voor anthelmintica
in boerderijmelk.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling DGM,
bibliotheek (1x), projectleider, projektbeheer,
circulatie, Keuringsdienst van Waren (Utrecht),
directie VZ, directie VD, dr Stephany (RIVM).

RAPPORT 86.98

Pr.nr. 505.0600

Projekt

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Onderwerp

Ontwikkeling van een FAST-LC methode voor anthelmintica in boerderijmelk.

Doel.

De automatische bepaling van de belangrijkste anthelmintica in boerderijmelk met behulp van FAST-LC op een detectieniveau van 10 ppb.

Samenvatting:

Er is, uitgaande van een op de KvWU ontwikkelde methode, een FAST-LC methode voor oxfendazol, mebendazol, albendazol, fenbendazol en flubendazol in melk opgezet. Hierbij werd met name de monsteropwerking via dialyse kritisch onderzocht, resulterend in een procedure waarbij de storingsgevoeligheid sterk wordt verminderd. Enige manuele voorbehandeling is noodzakelijk.

Conclusie

De methode van v. Gend et al bleek niet direkt operationeel te maken. Er traden verstoppingen op in het continuous flow systeem. Door voorafgaand aan de FAST-LC analyse de melk te behandelen met mierzuur, fysiologisch zout en azide werden de problemen ondervangen. Oxfendazol, mebendazol en flubendazol zijn te screenen vanaf het 10 ppb niveau, albendazol vanaf 20 ppb en fenbendazol vanaf 50 ppb.

Verantwoordelijk : drs M.M.L. Aerts

Medewerker/Samensteller: W.M.J. Beek *W.B.*

Projectleider : drs M.M.L. Aerts *Al*

Inleiding

De benzimidazol-2-carbamaten behoren tot de anthelmintica (anti-wormmiddelen) welke worden toegepast bij runderen, schapen, varkens en pluimvee.

Worminfecties komen veel voor bij landbouwhuisdieren. Antiwormmiddelen worden dan ook veelvuldig toegepast.

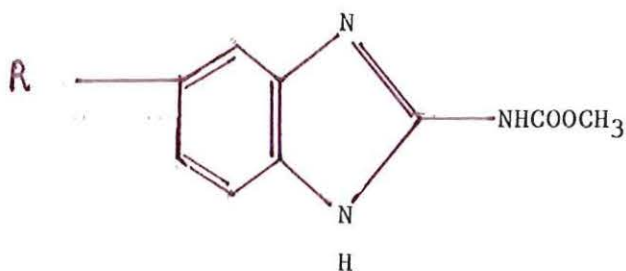
Toediening vindt plaats via injecties, drinkwater, voeder of zg. wormblokken. Toepassing van deze middelen kan aanleiding geven tot residuen in melk en/of vlees. Opsporing en controle op residuen ervan is dan ook gewenst.

Volgens Whatson (1) zijn de veelvuldigst toegepaste anti-wormmiddelen in Groot-Brittannië: fenbendazol, levamisol, thiabendazol en oxfendazol. In Nederland worden naast genoemde middelen ook alben-dazol, flubendazol, mebendazol, pyrantel en morantel toegepast (2). Voor de analyse van residuen wordt door Woestenborghs een gaschroma-tografische methode voor levamisol in weefsel vanaf een niveau van 5 µg/kg beschreven (5).

Analyses van benzimidazolen vinden voornamelijk plaats met hogedrukvlloeistofchromatografie (6 t/m 8). Voor oxfendazol en levami-sol zijn residumethoden in melk, met behulp van HPLC, beschreven op niveau's vanaf respectievelijk 5 en 50 µg/l (3,4). Een geheel geauto-matiseerde methode voor de analyse van een aantal anthelmintica in melk wordt beschreven door v.Gend et al (9).

Hiermee kunnen vier benzimidazolen gescreend worden in melk op een niveau vanaf 5 µg/l. Gezien het eigen onderzoek betreffende de ont-wikkeling van multimethoden via FAST-LC is getracht deze methode operationeel te maken binnen de afd. Diergeneesmiddelen. Daarbij stond het verrichten van eigen ontwikkelingswerk niet voorop.

2. Structuurformule en eigenschappen



oxfendazol R = C₆H₅SO -

mebendazol R = C₆H₅CO -

albendazol R = C₃H₇S -

fenbendazol R = C₆H₅S -

flubendazol R = C₆H₄FCO -

Alle genoemde middelen lossen redelijk op in mierzuur.

3. Uitvoering van de experimenten

3.1 Opzet van een FAST-LC methode

Zie schema (bijlage 1)

3.1.1 Monstervoorbereiding

Boerderijmelk wordt goed gemengd. Hierna wordt in een 25 ml buis respectievelijk 5 ml melk, 5 ml fysiologische zoutoplossing, 1 ml natriumazideoplossing (1%) en 1 ml gec.mierzuur gepipetteerd. Het geheel wordt goed gemengd. Hierna wordt het geheel 10 minuten gecentrifugeerd (2000 rpm, 10°C).

De heldere bovenlaag wordt in een 8,5 ml monstercupje van het FAST-LC systeem gebracht (eventueel vetlaagje afscheppen).

3.1.2 Concentrering en scheiding

Analyse vindt plaats door 10 minuten te bemonsteren. Het monster-materiaal wordt over twee (in serie gekoppelde) dialysers van 24 inch gevoerd met dialysemembranen (Technicon Type C art. 170-0472-02). De monsteroplossing wordt aangezogen met een snelheid van 0,6 ml/min.

De onderstroom (receptorstroom) is een 10% methanoloplossing. Concentrering van de stoffen, die zich in de onderstroom bevinden, vindt plaats op een Perisorb RP-2 (60*4.6 mm) 30 - 40 µm concentreringskolom met 20 µ frits. Tussen de 35e en 40e minuut vindt backflush van de componenten plaats op een Supelcosil LC-8 (150*4.6 mm) 5 µ kolom. Na 45 minuten wordt het volgende monster in behandeling genomen. Scheiding van de componenten geschiedt met behulp van het elutiemengsel 0,05 M ammoniumcarbamat-methanol (50-50) bij een debiet van 1,0 ml/min. Detectie van de componenten vindt plaats met UV bij 296 nm en 0,001 AUFS versterkerstand.

4. Bespreking

4.1 Scheiding en concentrering

Voor de chromatografische scheiding van genoemde anthelmintica met behulp van HPLC werd gekozen voor het elutiemiddel, dat ook reeds door Bogan (8) en door v.Gend (9) werd toegepast.

Met behulp van het mengsel 50-50 methanol-0,05 M ammoniumcarbamat konden met een Supelcosil LC8 kolom voor standaarden goede scheidingen worden verkregen. Bij toepassing van andere elutiemiddelen zoals water-acetonitril (75-25), acetonitril-methanol-0,05 M ammoniumcarbamat (100-400-500) konden geen goede scheidingen worden verkregen.

Op een Lichrosorb RP8 kolom konden ook met het 50-50 methanol-0,05 M ammoniumcarbamatmengsel geen scherpe pieken worden verkregen.

De scheiding lukt kennelijk alleen met een kolom met goede endcap zoals Supelcosil.

Omdat het eluens alkalisch is (pH 7,5), kan oplossen van de silica van de analysekolom plaatsvinden. Om deze te beschermen werd tussen de eluenspomp en 6-weg kraan een kolommetje geplaatst, gevuld met silica (60*3 mm, 5 µ frits). Het eluens raakt hierdoor verzadigd met eventueel opgeloste silica, zodat oplossen van de silica van de analysekolom niet kan optreden.

Detectie vindt plaats met U.V.

Een mengsel van de vijf anthelmintica in het eluens gaf een absorptiemaximum van 296 nm (bijlage 2).

Concentrering van de componenten, welke zich na dialyse in de onderstroom bevinden in het FAST-LC systeem, bleek mogelijk op Bondapak C18/Corasil materiaal. V. Gend (9) paste dit materiaal toe. Concentrering op Perisorb RP2 30-40 μ materiaal bleek eveneens mogelijk. Toepassing van Perisorb RP2 materiaal verdient de voorkeur, omdat dan tijdens het spoelen meer matrixcomponenten konden worden afgeëluëerd. Door in de onderstroom (receptorstroom) niet water maar een 10% methanoloplossing toe te passen konden nog meer matrixcomponenten worden verwijderd.

4.2 Lineariteit, detectiegrens en storingsanalyse

De bepaling in melk was lineair, voor alle componenten, in het gebied van 10-500 ppb (bijlage 3).

De detectiegrens bedroeg 10 ppb voor oxfendazol, mebendazol en flubendazol, 20 ppb voor albendazol.

Omdat bij fenbendazol een kleine storing werd waargenomen overeenkomend met een gehalte van ca. 15 ppb geldt hiervoor een detectiegrens van 50 ppb. De recovery, na toevoeging aan melk, vergeleken met standaarden was voor oxfendazol 88%, mebendazol 86%, flubendazol 83%, albendazol 87% en fenbendazol 56% (n=5 op 100 ppb niveau).

De bepaling wordt niet gestoord door de middelen:

amprolium, arprinocid, buquinolaat, carbadox, dinitolmide, ethopabaat, furazolidon, nitrofurazon, ipronidazol, ronidazol, dimetridazol, furnicozone, nitrovin, nifursol, metichlorpindol, robenidine, thiofanaat, pyranteltartrate, olaquinox, chlooramphenicol, halofuginon, methylbenzoquaate, decoquinaat, nicarbazine, dapson, sulfaquinoxaline, sulfadoxine, sulfadimidine, sulfadiazine, sulfanilamide onder de gekozen omstandigheden (3.1).

4.3 Monsteropwerking

De anthelmintica bevinden zich ook in het vet van de melk (9). Melk mag daarna niet worden ontroomd voordat deze in het FAST-LC wordt onderzocht. Bovendien zijn de anthelmintica moeilijk in water oplosbaar (wel in mierzuur) en dialyseren slecht vanuit melk naar een waterige receptor.

Alleen een zure of alkalische monsterstroom geeft een goede dialyse. Door v. Gend (9) werd dit opgelost door de monsterstroom alkalisch te maken met loog. Hierdoor werd de dialyse bevorderd.

De receptorstroom wordt daardoor alkalisch en zou het concentreringsmateriaal beschadigen. Daarom wordt voor pré-concentratie de pH op 5 gebracht met behulp van een citroenzuuroplossing.

Deze toegepaste methodiek bleek in onze handen verstoppingen in het continuous flow gedeelte te veroorzaken.

Het probleem werd opgelost door de melk eerst te behandelen met mierzuur en hierna te centrifugeren. De anthelmintica bevinden zich dan in de zure fase en niet meer in het vet. De heldere oplossing (pH 2,5) kan daarna zonder problemen in het systeem worden gebracht. Dialyse van de componenten bleek nu eveneens mogelijk.

Er werd nu geen verschil geconstateerd tussen toevoegen van standaarden aan melk, als waterige oplossing of indampen van in methanol verdunde standaarden en daarna opwerken volgens de in 3 beschreven methode.

5. Conclusie

De methode van v. Gend et al bleek niet direkt operationeel te maken. Er traden verstoppingen op in het continuous flow systeem. Door voorafgaand aan de FAST-LC analyse de melk te behandelen met mierzuur, fysiologisch zout en azide worden de problemen ondervangen. Oxfendazol, mebendazol en flubendazol zijn te screenen vanaf het 10 ppb niveau, albendazol vanaf 20 ppb en fenbendazol vanaf 50 ppb.

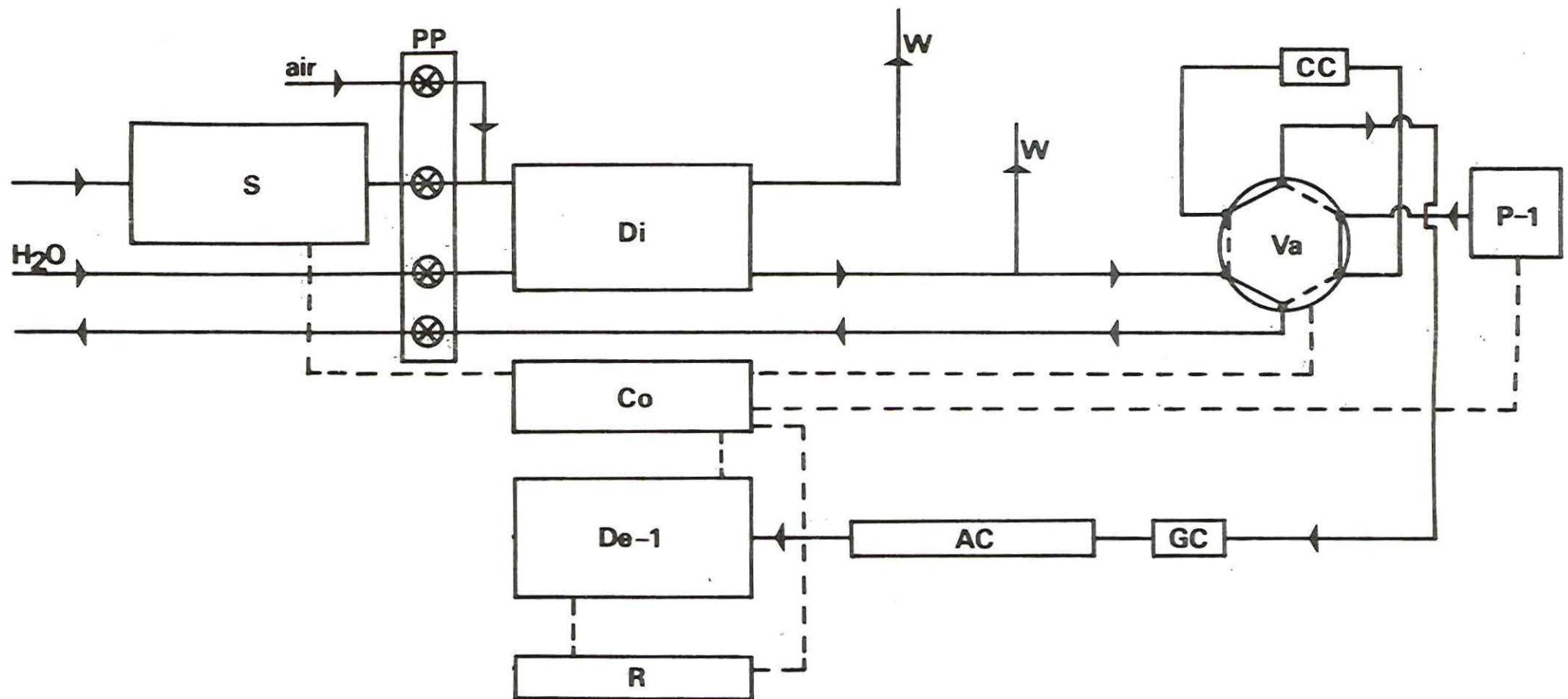
Bijlagen

1. Opstelling FAST-LC.
2. Absorptiespectrum anthelmintica.
3. Lineariteit anthelmintica.
4. Chromatogrammen blanco melk.
5. Chromatogrammen melk + 10 ppb.
6. Chromatogrammen melk + 100; 50 ppb.

Literatuur

1. D.H. Watson
Food Chemistry 12 (1983) 167-177.
2. J.H. Boersema
Tijdschrift. Diergeneesk. deel 108, afl.11, 1983, pp 426-429.
3. I.W. Tsina and S.B. Matin
J. Pharmaceutical Sciences vol.70, no.8, aug. 1981, pp 858-860.
4. B.G. Österdahl, H. Johnsson and I. Nordlander
J. Chromatography 337 (1985) 151-155.
5. R. Woestenborghs, L. Michielsens and J. Heykants
J. Chromatography 224 (1981) 25-32.
6. D.J. Austin, K.A. Lord and I.H. Williams
Pestic. Sci. 1976, 7, 211-222.
7. D. Mourot, J. Boisseau and G. Gayot
Analitica Chimica Acta 99 (1978) 371-374.
8. J.A. Bogan and S. Marriner
J. Pharmaceutical Sciences vol.69, no.4, april 1980, pp 422-423.
9. H.W. van Gend, W. van Leeuwen, R. Kommerij
Rapport nr. IR/73/01/86/D13.

Fully Automated Sample Treatment – Liquid Chromatography

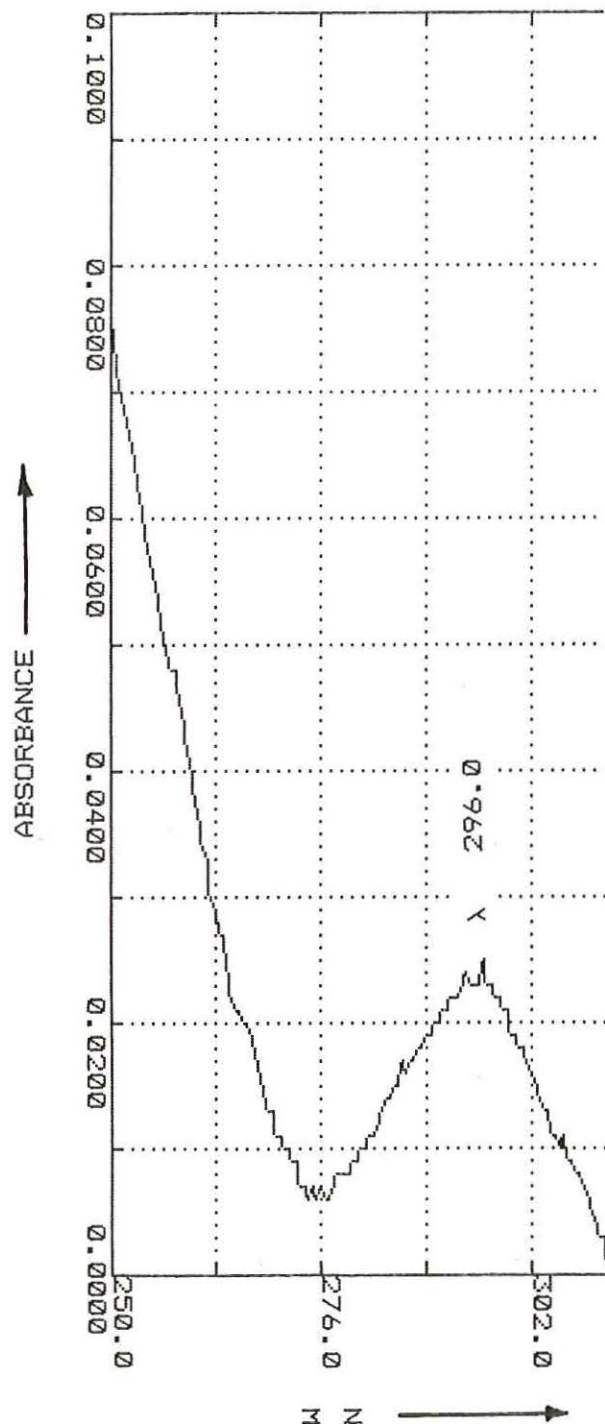


S sampler
 Di dialyser
 Va six-port valve
 CC concentration column
 P HPLC-pump

GC guard column
 PP peristaltic pump
 AC analytical column
 De detector
 R recorder

Co controller
 W waste

Absorptiespectrum.



Mengsel (in HPLC eluens)

oxfenotazol

mebendazol

flubendazol

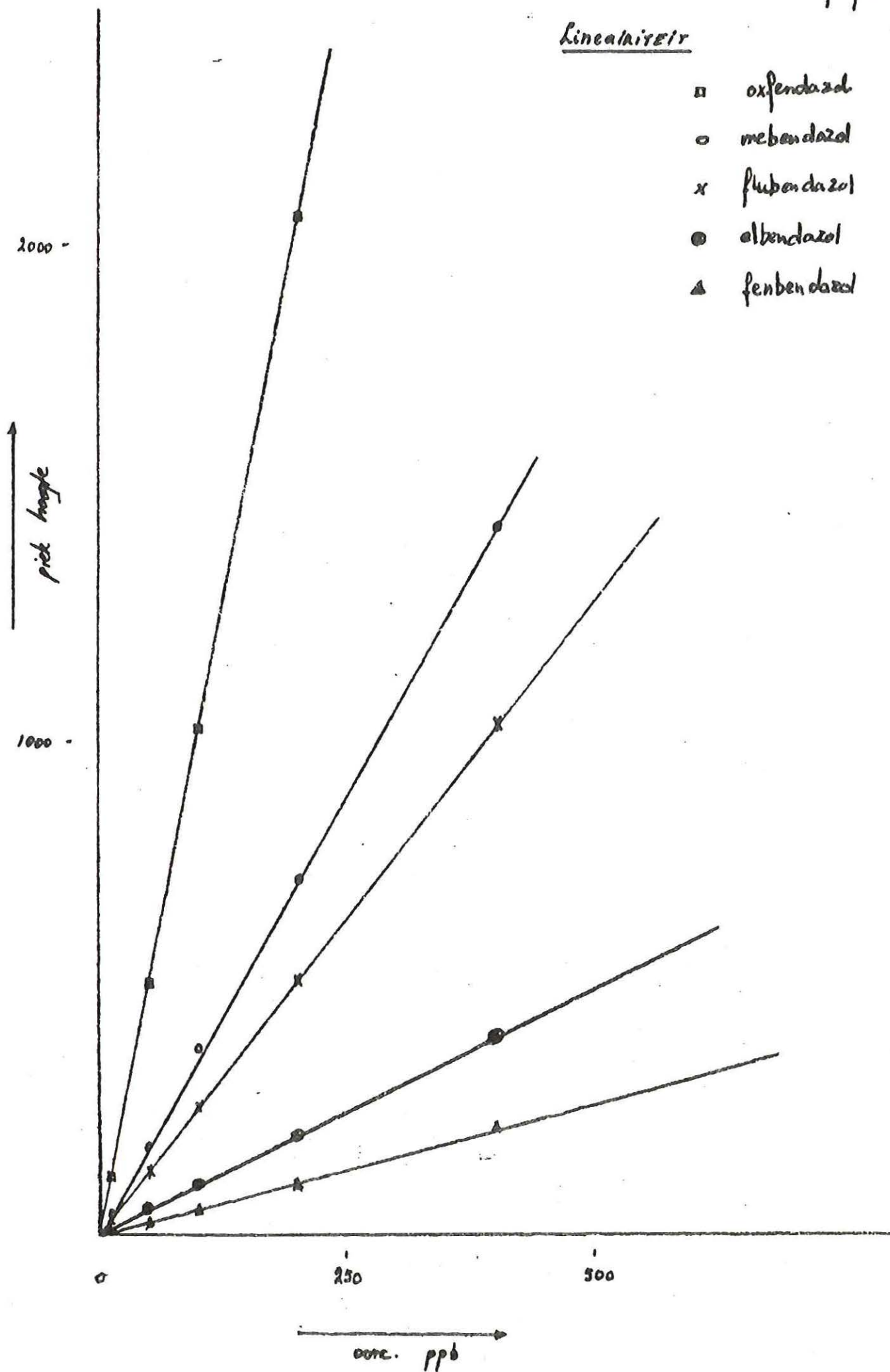
albenazol

fenbendazol

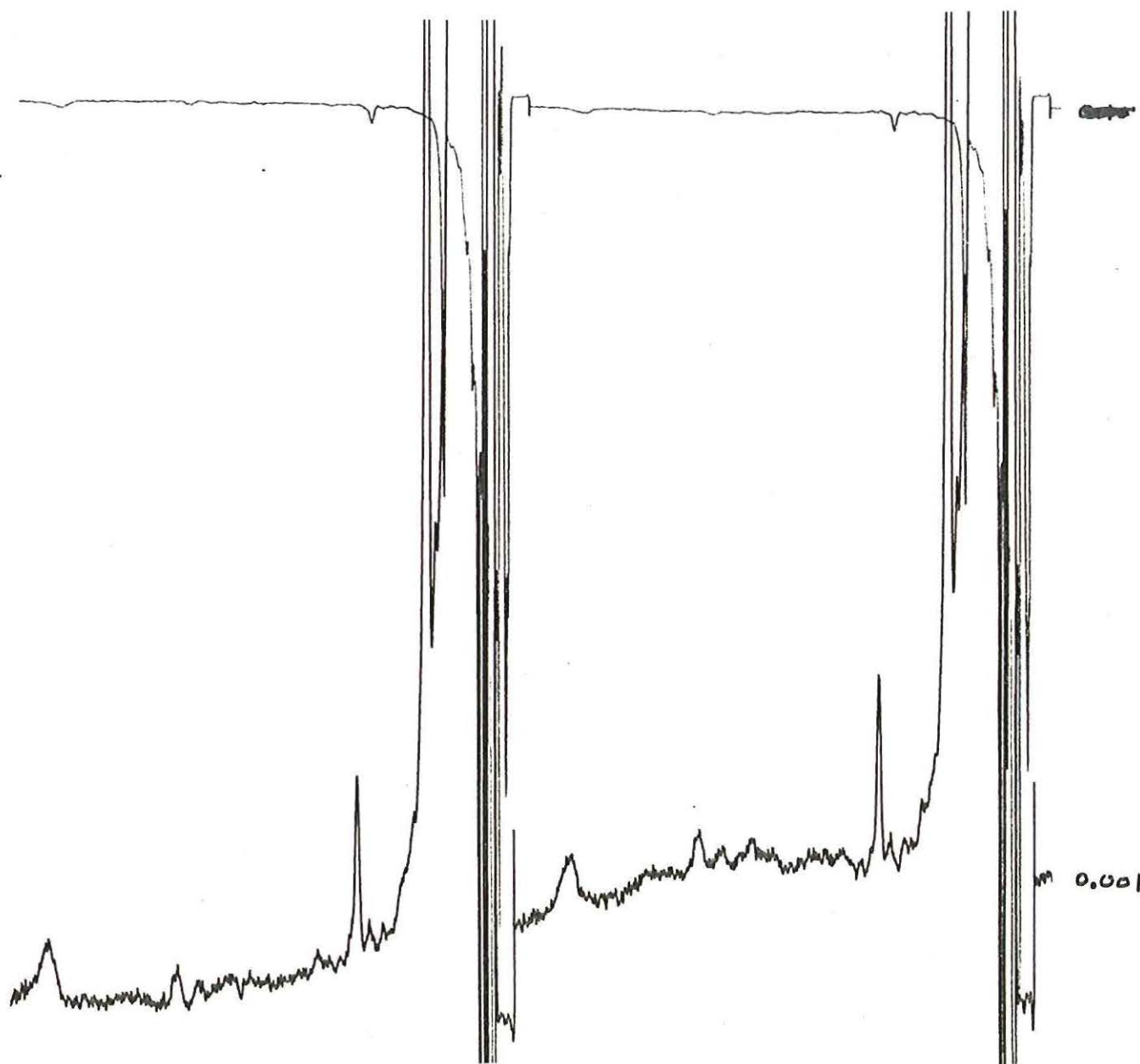
Scan Speed: 750 nm/min

Lineaire/r

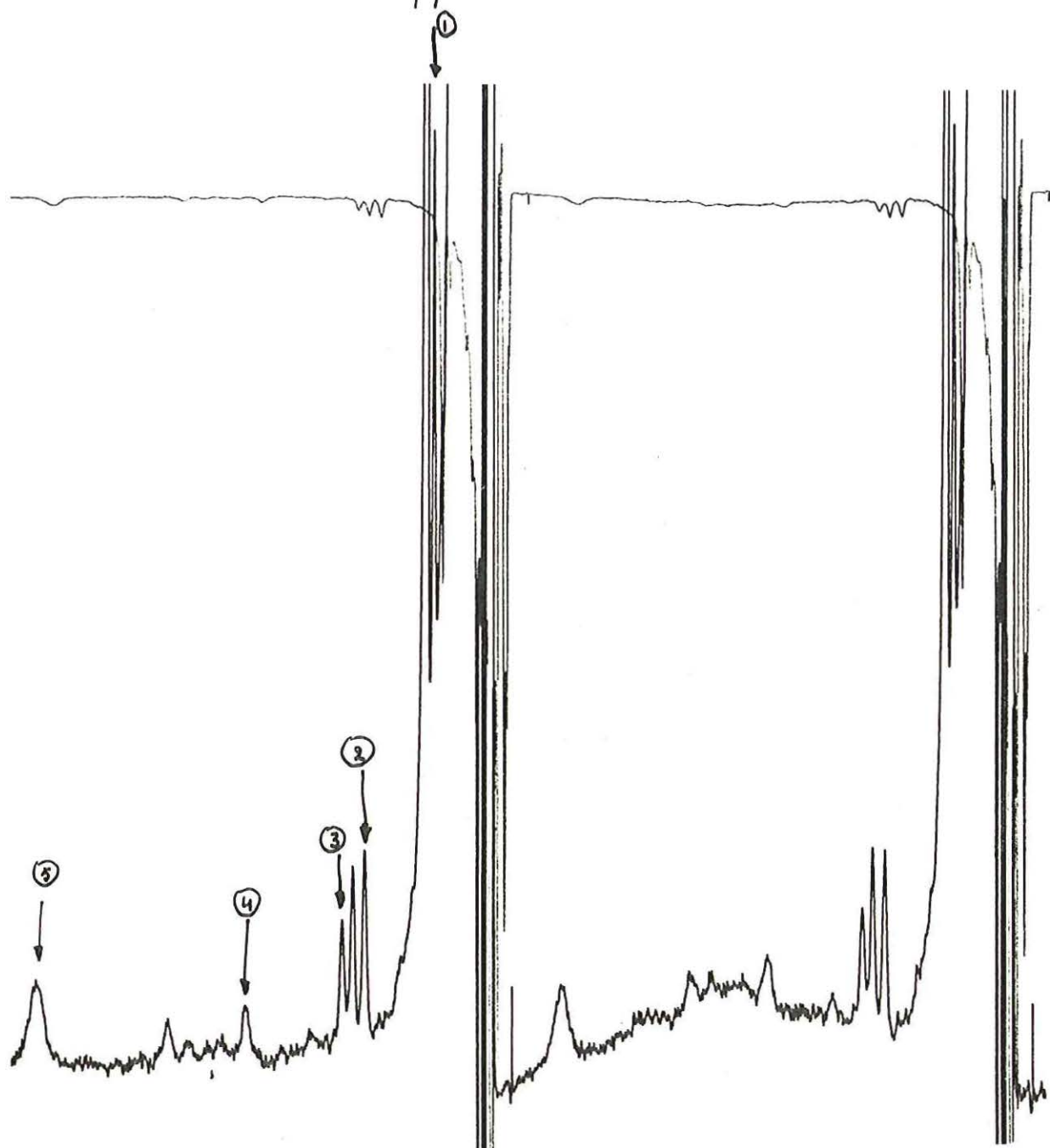
- oxpendazol
- mebendazol
- x flubendazol
- albendazol
- ▲ fenbendazol



Blanco melk



Blanco melk + 10 ppb



1. oxfendazol
2. mebendazol
3. flubendazol
4. albendazol
5. fenbendazol

melk

+ 100 ppb

+ 50 ppb

